



EESTI MAAÜLIKOOL
Veterinaarmeditsiini ja loomakasvatuse instituut

Hanna Raidvere

**VEISE *IN VITRO* TOODETUD EMBRÜOTE
VITRIFIKATSIOON JA ELUJÕULISUS PÄRAST
SULATAMIST**

**DIFFERENT EFFECTS OF VITRIFICATION MEDIA ON
BOVINE EMBRYO CRYOPRESERVATION AND VIABILITY
AFTER THAWING**

Bakalaureusetöö
Loomakasvatuse õppekava

Juhendaja: Elina Mark (MSc)

Tartu 2018

Eesti Maaülikool Kreutzwaldi 1, Tartu 51014		Bakalaureusetöö lühikokkuvõte	
Autor: Hanna Raidvere		Õppekava: Loomakasvatus	
Pealkiri: Veise <i>in vitro</i> toodetud embrüote vitrifikatsioon ja elujõulisus pärast sulatamist			
Lehekülgi: 40	Jooniseid: 6	Tabeleid: 17	Lisasid: 0
<p>Osakond / Õppetool: Sigimisbioloogia osakond / Tõuaretuse ja Biotehnoloogia õppetool</p> <p>ETIS-e teadusvaldkond ja CERC S-i kood: 1. Bio- ja keskkonnateadused; 1.12. Bio- ja keskkonnateadustega seotud uuringud, näiteks biotehnoloogia, molekulaarbioloogia, rakubioloogia, biofüüsika, majandus- ja tehnoloogiauuringud; CERCS ERIALA: T490 Biotehnoloogia</p> <p>Juhendaja: Elina Mark</p> <p>Kaitsmiskoht ja -aasta: Tartu, 2018</p>			
<p>Vitrifikatsioon on embrüote külmutamiseks väga edukas krüopreservatsiooni meetod. Üha uusi katseid viiakse läbi vitrifikatsioonimeetodite arendamiseks avastamaks, millistes tingimustes vitrifikatsioon kõige edukam on. Töö eesmärgiks on leida vitrifikatsiooniks kõige optimaalsem veise <i>in vitro</i> toodetud embrüo arengujärk ja krüopreservatsiooni lahus embrüote külmutamiseks. Käesolevas töös on kasutatud lisaks autori katsetulemustele võrdluseks ka Shirazi (2008), Taniguchi (2007), Van Huong Do (2017) ja teiste uurimistöid.</p> <p>Katsetes kasutati vitrifikatsiooniks nelja erinevat protokoll: (1) Bioscience lahustega külmutamine etüleenglükooli ja DMSO (dimetüülsulfoksiid) baasil, (2) IMV Technologies etüleenglükooliga külmutamine etüleenglükooli baasil, (3) etüleenglükooliga vitrifikatsioon etüleenglükooli ja DMSO baasil ning (4) IMV Technologies glütserooliga külmutamine glütserooli baasil. Pärast sulatamist hinnati veise embrüote elujõulisust ja arengut pärast 24 h kultveerimist.</p> <p>Katsete tulemusel leiti, et kõige edukam oli veise embrüote külmutamine laienenud</p>			

blastotsüsti arengufaasis (22% juhtudel elujõulised embrüod) võrreldes blastotsüsti (20%) ja koorunud blastotsüsti (6%) arengufaasidega.

Lisaks leiti, et kõige paremad vitrifikatsioonilahused veise embrüote külmutamisel baseeruvad etüleenglükoolil ja DMSO-l, andes paremaid embrüote ellujäämise tulemusi pärast sulatamist (32% ja 68%) võrreldes etüleenglükooli (9%) ja glütserooli baasil vitrifikatsiooni lahustega (0%).

Antud alal varem läbi viidud katsete erinevused tulenevad liiga paljude faktorite varieeruvusest – kasutatud on erinevaid lahuseid ja abivahendeid. Lühikese kestvusega külmutuskatsed, nagu käesolevas töös, annavad ülevaate embrüo esialgse elujõulisuse kohta. Lisaks tuleks katseid pikendada embrüosiirdamise- ja elussündide tulemuste saamiseks.

Märksõnad: veise embrüod, IVF, vitrifikatsioon, krüopreservatsioon, krüoprotektant.

Estonian University of Life Sciences Kreutzwaldi 1, Tartu 51014		Bachelor's Thesis	
Author: Hanna Raidvere		Curriculum: Animal Science	
Title: Different effects of vitrification media on bovine embryo cryopreservation and viability after thawing			
Pages: 40	Figures: 6	Tables: 17	Appendixes: 0
Department / Chair: Department of Reproduction Biology / Chair of Breeding and Biotechnology			
Field of research and (CERC S) code: Bio-and environmental sciences; 1.12. Studies in bio-and environmental sciences such as biotechnology, molecular biology, cell biology, biophysics, economics and technology studies; CERCS ERIALA: T490 Biotechnology			
Supervisor: Elina Mark			
Place and date: Tartu, 2018			
Vitrification is a successful cryopreservation method. A lot has been done to improve vitrification, but it can be more successful in the future.			
The aim of this study is to find which developmental stage is the most optimal to vitrify bovine embryos successfully and which cryopreservation solutions have the highest embryo survival rate.			
Shirazi (2008), Taniguchi (2007), Van Huong Do (2017) and other research studies were used in this thesis to find the right developmental stage of bovine embryos, cryopreservation solutions that are the most effective for successful vitrification and to compare the results.			
Four cryopreservation protocols were used in this thesis: (1) Bioscience solutions based on ethylene glycol and DMSO (dimethyl sulfoxide); (2) IMV Technologies ethylene glycol vitrification based on ethylene glycol; (3) Ethylene glycol vitrification based on ethylene glycol and DMSO; and (4) IMV Technologies glycerol vitrification based on glycerol.			
Survival rates were observed after 24 h following thawing process.			

In the present study, it was found that the best developmental stage for bovine embryo vitrification is expanded blastocyst stage (survival rate 22%), compared to blastocyst stage (20%) and hatched blastocyst stage (6%).

In addition, the results show higher bovine embryo survival rate with vitrification solution based on ethylene glycol and DMSO (32% and 68%) compared to the ethylene glycol based (9%) and glycerol based solution (0%).

Previous researches and present study tests show, that this field of study requires further investigations, because the results differ greatly from each other – previous researches this study is based on used different solutions and means of freezing. Short cryopreservation experiments, like in this study, give initial results, but they may not be accurate enough. Therefore experiments should last longer, up to embryo transfer and live births.

Keywords: bovine embryo, IVF, vitrification, cryopreservation, cryoprotectant.

SISUKORD

SISUKORD	6
TÖÖS KASUTATUD OSKUSSÕNADE JA LÜHENDITE SELETUS	7
SISSEJUHATUS	8
1. VEISE EMBRÜOTE TOOTMISTEHNOLOOGIAD	10
1.1. <i>In vitro</i> embrüote tootmine	10
1.2. <i>In vivo</i> embrüote tootmine	10
2. EMBRÜOTE KRÜOPRESERVATSIOON	12
2.2. Vitrifikatsioon	13
2.2.1. Vitrifikatsiooni ajalugu	13
2.2.2. Vitrifikatsiooni meetodika	14
2.2.3. Vitrifikatsiooni lahused	16
2.2.4. Embrüote hukkumise või kvaliteedi langemise põhjused enne vitrifikatsiooni	17
3. MATERJAL JA METOODIKA	19
3.1. Embrüote <i>in vitro</i> tootmine	20
3.1.1. Munarakkude aspireerimine	20
3.1.2. Munarakkude <i>in vitro</i> küpsemine	21
3.1.3. Munarakkude <i>in vitro</i> viljastamine	21
3.1.4. Munarakkude <i>in vitro</i> kultiveerimine	22
3.2. Embrüote krüopreservatsioon	22
3.2.1. Bioscience protokoll	22
3.2.2. IMV Technologies etüleenglükooliga külmutamise protokoll	23
3.2.3. Etüleenglükooliga vitrifikatsiooni protokoll	24
3.2.4. IMV Technologies glütserooliga külmutamise protokoll	24
3.3. Embrüote sulatamine	25
3.3.1. Bioscience protokoll	25
3.3.3. Etüleenglükooli vitrifikatsioon protokoll järgi sulatamine	28
4. TÖÖ TULEMUSED JA ARUTELU	30
KOKKUVÕTE	37
KASUTATUD KIRJANDUS	38

TÖÖS KASUTATUD OSKUSSÕNADE JA LÜHENDITE SELETUS

Blastotsüst – embrüo arengujärk, kus embrüo on 5-päevane (vanust arvestatakse alates viljastamise päevast), koosneb sisemisest rakumassist ja trophektodermist.

BSA (*Bovine Serum Albumin*) – veise seerumi albumiin (proteiin).

DMSO – dimetüülsulfoksiid, kasutatakse külmutamisel krüoprotektandina.

HEPES – bioloogiline puhver 4-(2-hüdroksüetüül)-1-piperasiinetaansulfoonhape.

IVC – (*in vitro cultivation*), munaraku katseklaasis kultiveerimine.

IVF – (*in vitro fertilization*), munaraku katseklaasis viljastamine.

IVM – (*in vitro maturation*), munaraku katseklaasis küpsemine.

Koorunud blastotsüst – embrüo arengujärk, kus blastotsüst on kestast välja tulemas või tulnud.

Krüoprotektant – külmutamisel kahjustuste eest rakku kaitsev keemiline aine.

Laienenud blastotüst – embrüo arengujärk, kus embrüo on 6-päevane.

OPS-kõrs – (*open pulled straw*), külmutamisel kasutatav embrüo hoiustamise kõrs.

Zona pellucida – glükoproteiinikiht, mis ümbritseb blastotsüsti plasmamembraani.

Vortex – tsentrifuugimiseks mõeldud aparaat.

SISSEJUHATUS

In vitro embrüote tootmine on organismilt pärinevate elusate rakkude kasvatamine kehaväliselt katseklaasis. Loomakasvatuses kasutatakse *in vitro* meetodil embrüote tootmist, et oleks võimalik kõrge aretusväärtusega veistelt rohkem järglasi saada, mis omakorda kiirendab põlvkondade vahetust ehk lühendab põlvkondade vahelist intervalli.

Lisaks *in vitro* embrüote tootmisele on väga kasulik olnud ka krüopreservatsioon ehk embrüote säilitamine külmutamise teel. Krüopreservatsioon annab võimaluse säilitada rakke pikka aega ja neid mugavalt transportida erinevatesse riikidesse, mis omakorda võimaldab efektiivselt erinevaid tõuge ja suguliine rikastada ning parandada. Lisaks sellele vähendab krüopreservatsioon haiguste levikut, väheneb loomade transpordiga seotud stress ja geneetilise materjali transpordile tehtavad kulutused. Krüopreservatsioon annab võimaluse säilitada ohustatud tõuge ja loomaliike, kelle säilimise nimel inimkond vaeva näeb ning lahendusi otsib. Üha laialdasemalt võetakse kasutusse krüopreservatsiooni meetodit – vitrifikatsiooni, mille abil on võimalik rakke kiiresti ja ilma keerulise ning kalli aparatuurita külmutada, mis näitab ka antud uurimistöö teema aktuaalsust, uudsust ning olulisust loomakasvatuse biotehnoloogia tuleviku suundade alal. Vitrifikatsiooni teel külmutamine on andnud häid tulemusi muude meetodite kõrval nagu aeglane külmutamine. Samas ei ole vitrifikatsioon suutnud täielikult asendada aeglast külmutamist, mis on nendest kahest laialdasemalt kasutusel. Antud uurimistöö peamine eesmärk on uurida, millistes tingimustes ja millises embrüo arengujärgus on veise embrüote külmutamine vitrifikatsiooni teel kõige edukam. Embrüoloogia alal viiakse järjepidevalt läbi üha uusi katseid vitrifikatsiooni edasi arendamiseks. Eelnevate uurimistööde

Katseteks koostati metoodika, mis tuvastaks veise embrüo külmutamiseks sellele sobivaima krüoprotektandi lahuse, kasutades ühe variandina Van Huong Do (2017) töömetoodikat. Lisaks kasutati uurimistöö tulemuste võrdluseks Shirazi (2008), Taniguchi (2007) ja teiste uurimistöid, leidmaks sobivaim veise embrüo arengujärk ja krüopreservatsiooni lahused vitrifikatsiooni teel külmutamiseks. Seega kasutati uurimistöö katsetes krüoprotektantide osas nelja erinevat protokollit: (1) Bioscience lahustega külmutamine, (2) IMV Technologies etüleenglükooliga külmutamine, (3)

etüleenglükooliga vitrifikatsioon ja (4) IMV Technologies glütserooliga külmutamine. Katsetes kasutatud munarakud hangiti tapamajast ning nende viljastamiseks kasutati eesti holsteini tõugu pulli Ziard (27481 EHF EE13993023) spermat. Bakalaureusetöö katsed viidi läbi Eesti Maaülikooli tõuaretuse ja biotehnoloogia õppetooli embrüolaboris.

Uurimistöö osadeks on töös kasutatud oskussõnade ja lühendite seletus, sissejuhatus, veise embrüote tootmistehnoloogiate ja krüopreservatsiooni tutvustav osa, materjal ja metoodika, töö tulemused ja arutelu, kokkuvõte ning kasutatud kirjandus.

1. VEISE EMBRÜOTE TOOTMISTEHNOLOGIAD

1.1. *In vitro* embrüote tootmine

In vitro embrüote tootmine on organismilt pärinevate elusate rakkude kasvatamine kehaväliselt katseklaasis. Embrüo *in vitro* tootmise eesmärk loomade aretuses on parimate emasloomade järglaste arvu suurendamine ning transpordi- ja spermakulude vähendamine. *In vitro* embrüote tootmine võimaldab kasutada munarakudoonoritena ka väga noori loomi, tänu millele lüheneb veistel põlvkondade vaheline intervall. (Gordon, 2017)

Veise *in vitro* embrüote tootmine koosneb kolmest osast: 1. munarakkude *in vitro* (kehaväline) küpsemine (*in vitro maturation* – IVM); 2. munarakkude *in vitro* viljastamine (*in vitro fertilization* – IVF); 3. embrüote *in vitro* kultiveerimine (*in vitro cultivation* – IVC). Kehaväline küpsemine on ebaküpse munaraku kasvatamine katseklaasis, kuniks see on viljastamiseks valmis. Kehaväline viljastamine on küpse munaraku kehaväline spermaga viljastamine ning kehaväline kultiveerimine on viljastunud munaraku kasvatamine katseklaasis spetsiaalses kasvulahuses. (Gordon, 2017)

Mark (2014) mainis oma magistritöös, et esimene vasikas, kes saadi *in vitro* teel viljastunud munarakust, sündis 1981. aastal Ameerikas. Esimene vasikas, kes saadi *in vitro* teel küpsenud ja viljastunud munarakust, sündis 1986. aastal Jaapanis. Eestis sündis esimene vasikas, kes saadi *in vitro* teel viljastamisest, 1994. aastal (Mark, 2014). 2018. aasta alguses sündis esimene lehmvasikas Eestis OPU-IVF meetodil saadud embrüo siirdamisel Tartu Agro Rahinge farmis (Koemets, 2018).

1.2. *In vivo* embrüote tootmine

In vivo embrüoid toodetakse elusorganismis ning eemaldadakse need doonorlooma organismist retsipientidele siirdamiseks. Veise *in vivo* toodetud embrüotega võrreldes on *in vitro* toodetud embrüote vitrifikatsioon mõnevõrra probleemsem (Dobrinsky, 2002).

Nimelt on *in vitro* toodetud embrüod krüopreservatsiooni suhtes tundlikumad kui *in vivo* toodetud embrüod - seoses lipiidide ja proteiinide osakaalu erinevusega (Dobrinsky, 2002; Massip, 2001). Massip (2001) on kirjutanud, et *in vivo* toodetud embrüotel on lipiidide sisaldus väiksem, kui *in vitro* toodetud embrüotel. Suurem lipiidide osakaal vähendab embrüo külmutamise taluvust. Gordon (2017) on lisanud, et selle probleemiga seoses on *in vitro* toodetud ja vitrifitseeritud embrüote siirdamisel madalam tiinestumisprotsent võrreldes *in vivo* toodetud veise embrüotega. *In vitro* embrüod on õrnemad, teistsuguse morfoloogia, struktuuri, ainevahetuse ja biokeemiaga.

Väiksemate mäletsejaliste puhul nagu kitsed ja lambad, on nii *in vitro* kui *in vivo* toodetud embrüote siirdamise tulemusel tiinestumisprotsendid sarnased (Dobrinsky, 2002).

Embrüote katseklaasis tootmine nõuab spetsiaalseid laboratoorseid masinaid ja oskusi, kuid on *in vivo* embrüote tootmise kõrval siiski odavam. 2010. aastal tegid Looney ja Pryor Ameerika Ühendriikides rahalise arvestuse, kus selgus, et ühe embrüo *in vitro* tootmisele kulub 20 dollarit. Võrdluseks toodi *in vivo* toodetud embrüo maksumus, mis oli 83 dollarit. (Gordon, 2017)

Embrüote *in vitro* tootmine on ülemaailmselt kasvanud – aastast 2012 aastani 2014 tõusis see 33,6% ja see osakaal tõuseb iga aastaga (Gordon, 2017). 2015. aastal toodeti maailmas 700 000 *in vitro* veise embrüot, mis oli esmakordselt suurem kogus *in vivo* toodetud veise embrüotest (Sanches *et al.*, 2017).

2. EMBRÜOTE KRÜOPRESERVATSIOON

Kudede ja rakkude säilitamine madalamatel temperatuuridel on protsess, mida kutsutakse krüopreservatsiooniks. Temperatuuri langetades metaboolsed protsessid rakkudes aeglustuvad ning rakke ja kudesid on võimalik külmutades säilitada pikka aega (Mandawala, *et al.*, 2016). Vajta ja Kuwayama (2006) on oma töös välja toonud, et peamiselt baseerub krüopreservatsioon krüoprotektantidel ja külmutamise-sulutamise kiirusel, ehk nende omavahelisel vahekorral. Kiiremaks külmutamiseks on vaja suuremat krüoprotektandi kogust, samas väiksema koguse krüoprotektandiga külmutamisel on vaja aeglasemat külmutamist. Selle järgi võib jaotada külmutamise vitrifikatsiooniks ja aeglaseks külmutamiseks (Vajta, Kuwayama, 2006).

Krüopreservatsioon mõjutab tugevalt embrüote morfoloogiat ja funktsionaalsust. Embrüote säilitamise edukus sõltub osaliselt embrüote kvaliteedist külmutamise hetkel: raku kuju, suurus, kvaliteet, tundlikkus ja membraani läbilaskvus. Lisaks sõltub edukus ka raku võimest taluda füüsilisi muutusi külmutamise protsessil. (Mandawala *et al.*, 2016; Vajta, Kuwayama, 2006)

Gupta *et al.* (2016) on märkinud, et krüopreservatsiooni kasulikkus seisneb võimaluses mugavalt ja turvaliselt transportida erinevatelt tõugudelt ja suguliindelt pärinevaid embrüoid ühest riigist teise. See loob võimaluse karjades loomade geneetilist potentsiaali parandada. Krüopreservatsioon vähendab haiguste levikut ja sellega on võimalik pikka aega säilitada näiteks ohustatud loomaliikide embrüoid (Chaves *et al.*, 2017). Gordon (2017) on leidnud, et 30 aasta jooksul pole teada ühtegi juhust, kus külmutatud embrüote transpordiga oleks haigusi üle kandunud. Krüopreservatsiooniga puudub elusloomade transport, mis on loomade tervisele kallis ja ohtlik (Gordon, 2017).

2.2. Vitrifikatsioon

2.2.1. Vitrifikatsiooni ajalugu

Vitrifikatsiooni avastamise ajaks peetakse 19. sajandi algust. Prantsuse füüsik Joseph Louis Gay-Lussac viis läbi katse, kus ta jahutas vett -12°C -ni, ilma et see külmuks. Tema avastusest sai vitrifikatsiooniprotsessi alus. (Arav, 2014)

Esimene õnnestunud vitrifikatsioon leidis aset 1938. aastal konna sperma peal, kus katse läbiviijad olid Basile J. Luyet ja Eugene L. Hodapp. Luyet kasutas katsetes erinevaid kolloide nagu želatiin, agar ja piim. Nad leidsid, et kolloidide veesisaldusel oli vitrifikatsiooni õnnestumiseks oluline roll. Katsete tulemusel avastasid nad, et mida väiksem on veesisaldus lahustes, seda edukam on vitrifikatsioon. (Arav, 2014)

1985. aastal viisid Rall ja Fahy läbi eduka vitrifikatsiooni katse hiire embrüo peal. Katse lahus koosnes dimetüülsulfoksiidist, polüetüleenglükoolist ja atseetamiidist. Lahuse, kus oli ka hiire embrüo, koguseks oli 0,25 mL, mis asetati kõrre sisse ja külmutati vedelas lämmastikus. Embrüote krüopreservatsioon vitrifikatsiooni teel ei leidnud aga laialdast kasutamist hoolimata edukast katsest. (Arav, 2014)

Alles aastal 1997 suutsid Leeuw, Daas ja Rall tõestada, et vitrifikatsiooni on võimalik veise embrüotega läbi viia ka laboriväliselt ning suures mahus, ilma et see vähendaks märgatavalt veiste tiinestumisprotsenti. Veistega tehtud embrüote siirdamiskatsete tulemuseks oli loomade tiinestuvus 44,5% ($n = 393$). Kontrolliks oli aeglane külmutamine 45,1% ($n = 335$) tiinestuvusega. Alates 1997. aastast on vitrifikatsiooni laialdasemalt kasutatud. (Dobrinsky, 2002)

Alminana ja Cuello (2015) on oma töös tutvustanud viimastel aastatel kasutusele võetud pinnatehnikat ja avatud süsteemi tehnikat, mille abil on olnud võimalik toksiliste lahuste kogust vähendada, samas külmutuse kiirust suurendades. Pinnatehnika ja avatud süsteem on meetodid, mille kasutamisel vitrifitseeritakse embrüoid väheses lahuse koguses (0,1 kuni 1 μL). Lisaks põhinevad uued süsteemid lahuse ja vedela lämmastiku otsesel kokkupuutel (Alminana, Cuello, 2015). Otsest kokkupuudet vedela lämmastikuga

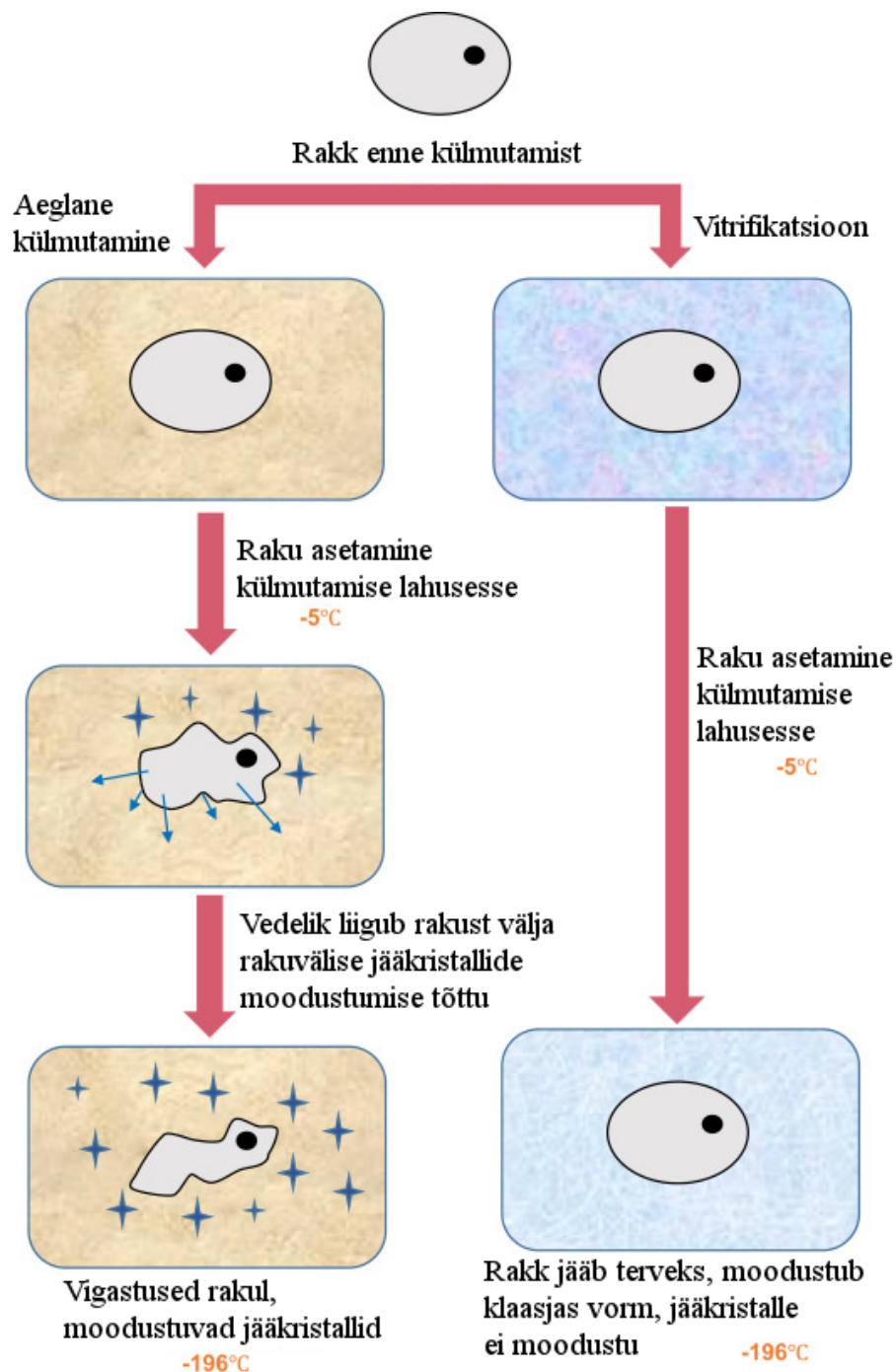
võimaldavad OPS-kõrred (*open pulled straw*), *cryoloop*, *microdroplet*’id ja *cryotop* meetodid (Sanches *et al.*, 2017). Lisaks on edasi arendatud ka krüoprotektantide kasutamist ja kasvanud on teadmised erinevate krüoprotektantide kasutamise koosmõjust, mis teeb külmutamise efektiivsemaks (Alminana, Cuello, 2015).

Vitrifikatsioon ei ole asendanud aeglast külmutamist, kuid seda kasutatakse laialdaselt juhtudel, kus vitrifikatsioon annab paremaid tulemusi kui aeglane külmutamine nagu varajases arengujärgus olevate ja *in vitro* toodetud embrüote külmutamine. (Alminana, Cuello, 2015)

Vitrifikatsiooni puhul on edasi arendatud ka võimalust kasutada embrüoid, milles sisalduvat krüoprotektanti ei pea pärast embrüo sulatamist astmeliselt lahjendama. Värskeste embrüote siirdamisel on lehmadel tiinestuvus 60%, vitrifikatsiooni teel külmutatud ja sulatatud embrüote puhul on lehmadel tiinestuvus 44,4%. (Alminana, Cuello, 2015)

2.2.2. Vitrifikatsiooni metoodika

Vitrifikatsioon on väga kiire embrüo külmutamine, kus embrüo pannakse krüoprotektandi sisse ning asetatakse koheselt vedelasse lämmastikku (Gordon, 2017). Vitrifikatsiooni puhul kasutatakse krüoprotektandi lahuseid embrüote dehüdreerimiseks, mis minimeerivad jääkristallide teket (Cryoconservation of animal..., 2012). Sellise meetodiga jahutatakse embrüo väga kiiresti, mille tõttu vedelik tahkub ja muutub klaasjaks amorfseks vormiks (Gupta *et al.*, 2016). Kiire jahutamise korral ei teki embrüol külmašokki ega jahutamise kahjustusi (Cryoconservation of animal..., 2012). Nii Gupta *et al.* (2016) kui ka Mandawala *et al.* (2016) on maininud oma töös, et tänu klaasjale amorfsele konsistentsile säilitab rakk oma kuju. Aeglase külmutamise puhul võib juhtuda, et vedelik liigub raku seest välja ja kristalliseerub ning krüoprotektant ei jõua raku sisse vee asemele minna, mistõttu raku kuju ei säili ja rakk võib viga saada (Gupta *et al.*, 2016; Mandawala *et al.*, 2016). Protsess on näidatud joonisel 1.



Joonis 1. Raku muutuste võrdlus aeglasel külmutamisel ja vitrifikatsioonil (Allikas: Mandawala *et al.*, 2016).

Vitrifikatsiooniga võivad kaasned probleemid nagu kõrge krüoprotektantide kontsentratsiooni tõttu toksilisus rakule. Embrüo kahjustusi saab vältida krüoprotektantide koguste vähendamisel. Krüoprotektantide toksilist mõju rakkude suhtes on võimalik vähendada, kasutades erinevaid rakumembraanist läbivaid ja mitteläbivaid krüoprotektantide segusid või lisades juurde seerumi albumiini (BSA), mis on saadud

veistelt. Vitrifikatsiooni puhul peab ka sulatamise läbi viima kiiresti, kuna vastasel juhul võivad tekkida jääkristallid. (Cryoconservation of animal..., 2012)

Vitrifikatsiooni eeliseks aeglase külmutamisega võrreldes on see, et selle läbiviimiseks ei ole vaja kallist ja keerulist aparatuuri, mis võimaldab sellega tegeleda ka väljaspool laborit. Samas on vitrifikatsiooni läbiviimiseks vaja koolitatud personali. (Alminana, Cuello, 2015; Gordon, 2017)

2.2.3. Vitrifikatsiooni lahused

Oluline komponent embrüote krüopreservatsioonis on krüoprotektant, millela embrüod ei elaks külmutamisprotsessi üle (Mandawala *et al.*, 2016; Vajta, Kuwayama, 2006). Samas on oluline viia krüoprotektandi ja embrüo kokkupuute aeg miinimumini, et krüoprotektant ei jõuaks avaldada embrüole toksilist mõju (Kasai, Edashige, 2007).

Bondioli (2014) on oma töös öelnud, et peamiselt kasutatakse lahuseid, kus on segatud kokku vähemalt kaks rakumembraani läbivat krüoprotektanti ja üks mitteläbiv krüoprotektant. Tõhusad rakumembraani läbivad krüoprotektandid, mida külmutamisel kasutatakse on DMSO (dimetüülsulfoksiid), etüleenglükool ja glütserool. Mitteläbivatest krüoprotektantidest kasutatakse sahharoosi ja trehhaloosi. Youngs (2011) on kirjutanud, et krüoprotektantide eesmärgiks on luua osmootne gradient, mis võimaldaks vajalikku veetustamist embrüos. Kui embrüotes on pärast veetustamist tekkinud osmootne tasakaal, on võimalik neid kahjustamata külmutada (Youngs, 2011). Vitrifikatsiooni puhul on vajalik, et krüoprotektantide lahuse kontsentratsioon oleks 5-8 mol/L (Kasai, Edashige, 2007).

Sahharoos on väga hea rakumembraani mitteläbiv krüoprotektant, kuna see vähendab hästi teiste krüoprotektantide toksilist mõju ja ei ole ise seejuures toksiline, samas hoiab sulatamise käigus ära osmootse paisumise (Kasai, Edashige, 2007).

Gordon (2017) ja Hasler (2014) on oma töös tutvustanud etüleenglükooli, mida on mitmeid aastaid edukalt kasutatud krüoprotektandina veise embrüote külmutamisel. See on embrüo membraani läbiv krüoprotektant, mistõttu ei pea sulatamisel krüoprotektanti astmeliselt

lahjendama. Seega saab etüleenglükooli kasutada embrüosiirdamisel retsiipiendile pärast selle sulatamist. Esimesed edukad embrüote külmutamised ja embrüosiirdamised retsiipienti kasutades etüleenglükooli toimusid 1992. aastal (Hasler, 2014). Juba 1997. aastal kasutati etüleenglükooli embrüote aeglaseks külmutamiseks ja siirdamiseks Ameerikas 55,4% ja Kanadas 87,6% juhtudel (Gordon, 2017).

Kasai (2007) koostas etüleenglükooli põhise vitrifikatsiooni lahuse EFS40, mis sisaldas peale 40% etüleenglükooli ka mitte-toksilisi aineid nagu sahharoos. Veise blastotsüstide kasutamisega on nimetatud lahusega teostatud katsed olnud edukad, ehk 10-st veisest on tiinestunud 8, samas on vasikaid sündinud vaid 30% juhtudel.

Bondioli (2007) tutvustas oma töös glütserooli, rakumembraani läbivat krüoprotektanti, mida kasutatakse tõhusalt nii aeglasel külmutamisel kui ka vitrifikatsioonil. Juba aastal 1949 avastati selle võime hoida ära külmutamise teel võimalikke raku vigastusi. Glütserooli puuduseks on embrüos osmootilise šoki tekitamise oht. Abiks on glütserooli kontsentratsiooni astmeline muutmine, kasutades teise krüoprotektandina sahharoosi (Bondioli, 2014). Samas võib glütserooli kohta öelda, et see on blastotsüstide suhtes vähem rakumembraani läbiv kui etüleenglükool (Taniguchi *et al.*, 2007).

2.2.4. Embrüote hukkumise või kvaliteedi langemise põhjused enne vitrifikatsiooni

Mark (2014) mainis oma töös, et embrüote suremuse üheks faktoriks võib olla nende saastumine mikroobide ja hallitustega. Saastunud võivad olla nii munarakud kui ka sperma nende peamiseks saastajateks on *Escherichia coli* ja *Candida* liigid. Paljudel juhtudel aitab selle vastu lahustesse lisatud antibiootikum (Taniguchi *et al.*, 2007). Koguni 74% *Escherichia coli* liikidest on aga lahustes kasutatavate antibiootikumide suhtes resistentsed (Mark, 2014). Edukate katsete läbiviimiseks on vaja rangelt kinni pidada labori hügieeninõuetest, kuna näiteks juuksekarva sattumisel proovi võib saastajaks olla *Staphylococcus aureus*. Hügieeninõuete mittetäitmisel võivad katsed ebaõnnestuda, kuna embrüod saastuvad ja hukuvad.

Samas ei ole hügieen ainuke saastetegur, mis võib embrüote tootmises suurt kahju tekitada. Paljudes Euroopa embrüolaborites esineb igal aastal *in vitro* embrüoototmisel saastust.

Kastrop viis sigimislaboris läbi uurimuse, mis kestis 8 aastat (1997-2004). Katsete peamiseks mikrobiaalseteks saastajateks olid *Escherichia coli* (58,9%), *Candida* liigid (25,3%) ja hallitus *Aspargilles terreus*, mis võis olla tingitud saastunud õli kasutamisest embrüote kultiveerimisel. Ülejäänud saastusallikad pärinesid spermast. (Kastrop *et al.*, 2007)

3. MATERJAL JA METOODIKA

Bakalaureusetöö jaoks vajalikud katsed viidi läbi Eesti Maaülikooli tõuaretuse ja biotehnoloogia õppetooli embrüolaboris. Töö eesmärgiks oli võrrelda erinevate lahuste ja protokollide efektiivsust ja sobilikkust erinevas arengujärgus olevate *in vitro* toodetud veise embrüote vitrifikatsioonil. Katsed viidi läbi blastotsüstide, laienenud blastotsüstide ja koorunud blastotsüstide peal. Kõik katses kasutatavad veise embrüod toodeti laboris samade lahustega. Käesolevas töös kasutati OPS-kõrsi (*open pulled straw*).

OPS-kõrtega on embrüote külmutamise ja sulatamise kiirus 10 korda suurem teistest külmutamise vahenditest, kuna külmutamisel kasutatakse tavalise 5 µl asemel vähem kui 1 µl krüoprotektanti. Tänu kiirele külmumisele ei jõua krüoprotektandid embrüotele toksilist mõju avaldada. Kuna kõrs on tavalisest 0,25 µl kõrrest poole väiksem ja sellest tulenevalt ka vedeliku maht väiksem, on oht juhuslikuks kõrre ülessulamiseks. Kui toatemperatuuril ei juhtuks 0,25 µl kõrres olevate külmutatud embrüodega 1 sekundi jooksul midagi, siis OPS-körres olevad külmutatud embrüod võivad selle ajaga juba üles sulada. (Naik *et al.*, 2005; Vajta, Nagy, 2006)

Kõik veise embrüod sulatati kõige varasemalt kaks nädalat pärast külmutamist. Embrüote elujõulisust ja arengut pärast sulatamist hinnati 24 h möödumisel. Veise embrüoid külmutati nelja erineva protokolliga põhjal: 1) Bioscience lahuste ja protokolliga, 2) etüleenglükooliga külmutamise protokolliga, 3) etüleenglükooliga vitrifikatsiooni protokolliga, 4) glütserooliga külmutamisega. Etüleenglükooliga külmutamise ja glütserooliga külmutamise protokollid on saadud firma IMV Technologies poolt. Etüleenglükooliga vitrifikatsiooni protokoll võeti Van Huong Do (2017) uurimusest.

Peamiselt kasutati teadusartiklite leidmisel ScienceDirect, ResearchGate ja Google Scholar otsingumootorit. Teadusartikleid valiti aja- ja teemakohasuse järgi ehk millises arengujärgus veise embrüoid on kõige parem külmutada ning milliste lahustega on vitrifikatsioon kõige edukam. Uurimistöö käigus dokumenteeriti katsete tulemused kirjalikult tabelsüsteemi. Kirja pandi veise embrüote *in vitro* tootmise kuupäevad, kellaajad, kestusja lahused ning nende kogused, munasarjade võtmise kohad, saabumise

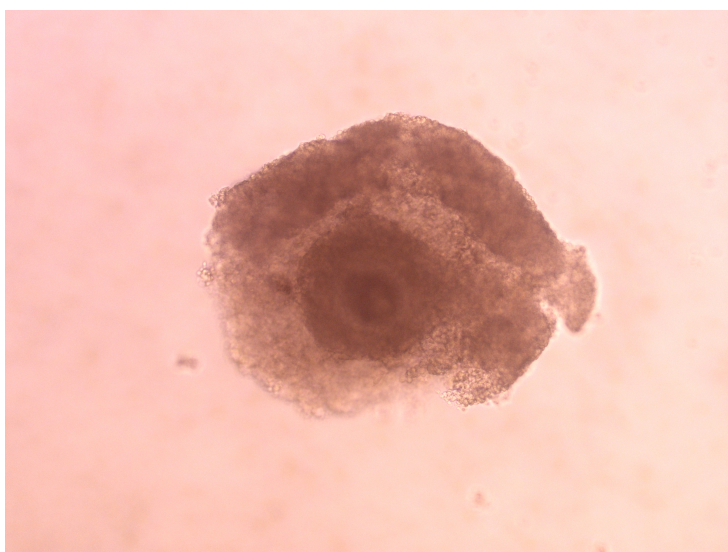
kellaajad, munasarjade saabumise temperatuur, arv, saadud munarakkude arv ja kvaliteet, pulli andmed, sperma kontsentratsioon ja liikuvus. Lisaks märgiti veel külmutatavate embrüote arengufaas ja arv, läbiviimise kuupäevad, fiksaatori märgis, lahuste koostis ning nende kogused. Sulatamisel märgiti ära kuupäev, lahused ja nende kogus, embrüote arv ja 24 h möödumisel elujõuliste embrüote osakaal ja arengujärk.

3.1. Embrüote *in vitro* tootmine

3.1.1. Munarakkude aspireerimine

Veise *in vitro* embrüote tootmiseks kasutatavad lahused pärinesid firmast IVF Bioscience, kui pole märgitud teisiti.

Munasarjad toodi Rakvere tapamajast 0,9% naatriumkloriidi ja gentamütsiini lahuses, mida hoiti 33 °C juures. Munasarjad pesti NaCl lahusega 2 korda. Munarakud aspireeriti vaakumi abil 15 ml tuubidesse, kus need sadenesid follikulaarvedeliku põhja. Follikulaarvedelik aspireeriti tuubist ja munarakud pipeteeriti koekultuuri tassile, milles oli 5 ml pesulahust (*BO-Wash*). Välja valiti ühtlase ja kompaktse, vähemalt 3 kuumuluse rakukihiga kvaliteetsed munarakud nagu on näha joonisel 2. Munarakke pesti 3 korda koekultuuri tassidel, mis sisaldasid 3 ml pesulahust. (Do *et al.*, 2017)



Joonis 2. Ühtlase, vähemalt 3 kuumuluse rakukihiga veise munarakud (Autor: E. Mark, 2017).

3.1.2. Munarakkude *in vitro* küpsemine

Munarakud pipeteeriti pesulahusest tassile, mis sisaldas 3 ml küpsemislahust (*BO-IVM*). Edasi pipeteeriti munarakud 4-kannulisse tassi (joonis 3) grupeerituna 50 kaupa. Igas kannus oli 500 µl *BO-IVM* lahust. Munarakkudega tass asendati temperatuuril 38,8 °C inkubaatorisse 22-24 tunniks küpsema. (Do *et al.*, 2017)



Joonis 3. Loputustassid ja 4-kannuline tass (Allikas: Sigma-Aldrich, *s. a.*).

3.1.3. Munarakkude *in vitro* viljastamine

Sperma ettevalmistus

Vedela lammastiku sperma võeti munarakkude viljastamiseks eesti holsteini tõugu pulli Ziard (27481 EHF EE13993023) sperma. Sperma kõrs asetati koheselt 37 °C veega täidetud termosesse sulama. Kõrre otsad lõigati lahti ja sperma asetati 15 ml tuubi, milles oli eelnevalt soojendatud 5 ml sperma pesulahust (*BO-SemenPrep*). Spermat tsentrifuugiti 5 minutit 400-kordse kiirusega, et see põhja sadeneks. Pesulahu eemaldati pealt vaakumiga. Lisati veel 3,5 ml sperma pesulahu ja tsentrifuugiti uuesti 5 minutit 400-kordse kiirusega. Mõlemad tsentrifuugimised toimusid toatemperatuuril. Sperma pealt eemaldati kogu pesulahu ja võeti spermide loenduseks 5 µl spermat.

Spermide loendamine

Spermide kontsentratsiooni loendamiseks koostati lahjendus, mis sisaldas 95 µl destilleeritud vett ja 5 µl spermat. Loenduskambrile pipeteeriti 15 µl sperma lahjendust. Sperme loeti 5 ruudu jagu diagonaalis ülevalt alla ja liideti omavahel kokku. Summa korrutati 20-ga ja 50-ga. Tulemus näitas, kui palju oli sperme 1 µl spermas. 50 munaraku kohta pipeteeriti viljastamislahusesse 1 000 000 spermi.

Munarakkude *in vitro* viljastamine

Munarakud loputati 50 kaupa viljastamise lahuses (*BO-IVF*). Seejärel pipeteeriti munarakud 50 kaupa gruppidesse 4-kannulisele tassile, igas kannus oli 400 µl *BO-IVF* lahust. Igasse kannu pipeteeriti 1 000 000 spermi. Munarakke ja sperme inkubeeriti koos 19-21 tundi 38,8 °C juures 6% süsisihappegaasi sisaldusega inkubaatoris. (Do *et al.*, 2017)

3.1.4. Munarakkude *in vitro* kultiveerimine

Sügoodid pipeteeriti 15 ml tuubi, milles oli 1 ml pesulahust. Kuumulusekihi eemaldamiseks sügootide küljest kasutati 2 minuti jooksul Vortexit. Lahus koos sügootidega pipeteeriti loputustassi kaanele, millelt pipeteeriti sügoodid loputustassi, milles oli 3 ml pesulahust. Sügoote pesti pesulahuses 2 korda ja viljastunud munarakkude kultiveerimislahuses (*BO-IVC*) 1 korra. Edasi pipeteeriti sügoodid 50 kaupa 4-kannulisele tassile, kus igas kannus oli 500 µl *BO-IVC* lahust ja selle peal 400 µl mineraalõli ehk vedelat parafiini (*BO-Oil*). 4-kannulise tassiga pandi sügoodid 7-8 päevaks 38,8 °C juures 6% süsisihappegaasi sisaldusega inkubaatorisse.

3.2. Embrüote krüopreservatsioon

3.2.1. Bioscience protokoll

Protokollis kasutati *BO-Vitricool* lahuste kompleksi, mis sisaldab *BO-Pre-Incubation*, *BO-Cooling 1* ja *BO-Cooling 2* lahust. Lahuste komplekt baseerus etüleenglükoolil ja dimetüülsulfoksiidil (Tabel 1).

Veise embrüote külmutamine viidi läbi embrüote 7-l või 8-l arengupäeval. Valiti välja morfoloogiliselt kvaliteetsed blastotsüstid, laienenud ja koorunud blastotsüstid, mis esmalt pipeteeriti 100 µl hoiustamise lahuse (*BO-Pre-Incubation*) tilka 2 minutiks. Edasi pipeteeriti blastotsüstid 5-6 kaupa 2 minutiks 80 µl *BO-Cooling 1* lahuse tilka, siis 30 sekundiks *BO-Cooling 2* lahuse tilka. 30 sekundi möödudes pipeteeriti blastotsüstid loputustassi kaanele, millest imeti embrüod OPS-körde võimalikult vähesel vedelikuga ja asetati koheselt vedelasse lämmastikku.

Tabel 1. Bioscience külmutamise protokollil põhinevad lahused, nende kogused (µl) ja kasutamise aeg (min)

Lahuse kogus	BO-Pre-Incubation, minutit	BO-Cooling 1, minutit	BO-Cooling 2, minutit
100 µl	3		
80 µl		2	
80 µl			0,5

3.2.2. IMV Technologies etüleenglükooliga külmutamise protokoll

Protokolli lahused baseerusid etüleenglükoolil (Tabel 2). Veise embrüote külmutamine viidi läbi 8 arengupäeval toatemperatuuril olevate lahustega. Valiti välja kõige sobilikumad ja elujõulisemad blastotsüstid ning laienenud blastotsüstid, mis pipeteeriti 2 ml hoiustamislahusesse (firma *BoviHold – Minitube Holding Medium*), milles embrüod viibisid minimaalselt 3 minutit. 4-6 embrüot pipeteeriti 5 minutiks 80 µl etüleenglükooli sisaldavasse külmutuslahusesse. Embrüod pipeteeriti väikese koguse vedelikuga loputusklaasi kaanele, mille pealt imeti OPS-körde. Kõrs asetati koheselt vedelasse lämmastikku.

Tabel 2. IMV Technologies etüleenglükooliga külmutamise protokollil põhinevad lahused, nende kogused (ml, µl) ja kasutamise aeg (min)

Lahuse kogus	Hoiustamislahus, minutit	Külmutuslahus, minutit
2 ml	>3	
80 µl		5

3.2.3. Etüleenglükooliga vitrifikatsiooni protokoll

Protokolli lahused baseerusid etüleenglükoolil ja DMSO'l (Tabel 3). 7. päeval viidi külmutamine läbi, eelnevalt oli valmis pandud 60 µl tasakaalulahust (7,5% firma IMV Technologies etüleenglükooli, 7,5% DMSO, 1% BSA ja 84% TCM-199) ja 60 µl vitrifikatsioonilahust (15% etüleenglükooli, 15% DMSO, 70% TCM-199 ja 0.5 M sahharoosi). OPS-kõrrest lasti embrüod vähemalt 3 minutiks 2 ml hoiustamislahusesse (*BoviHold – Minitube Holding Medium*), kus valiti külmutamiseks välja morfoloogiliselt kvaliteetsed embrüod. Kuni 5 embrüot pipeteeriti 60 µl tasakaalulahuse tilka 3 minutiks, pärast mida tõsteti need ümber kuni 1 minutiks 60 µl vitrifikatsioonilahusesse. 0,1 µl lahusega pipeteeriti embrüod tassi kaanele, imeti OPS-körde ja asetati koheselt vedelasse lämmastikku. Meetodit kasutas Van Huong Do *et al.* (2017).

Tabel 3. Etüleenglükooliga vitrifikatsiooni protokollil põhinevad lahused, nende kogused (ml, µl) ja kasutamise aeg (min)

Lahuse kogus	Hoiustamislahus, minutit	Tasakaalulahus, minutit	Vitrifikatsioonilahus, minutit
2 ml	>3		
60 µl		3	
60 µl			1

3.2.4. IMV Technologies glütserooliga külmutamise protokoll

Protokolli lahused baseerusid glütseroolil (Tabel 4). Katse viidi läbi 7. arengupäeval toatemperatuuril. Välja valiti elujõulised blastotsüstid, laienenud blastotsüstid ja koorunud blastotsüstid ning pipeteeriti vähemalt 3 minutiks 2 ml hoiustamislahusesse (*BoviHold*). Blastotsüstid pipeteeriti 5-6 kaupa 4-kann tassi, esimesse kannu külmutuslahus 1 (333 µl *BoviHoldi* lahust ja 167 µl glütserooliga külmutamislahust EFMG – *Embryo Freezing Media with Glycerol*) sisse 5 minutiks. Edasi pipeteeriti blastotsüstid külmutuslahus 2 (250 µl nii *BoviHoldi* kui EFMG lahust) sisse 5 minutiks. Külmutuslahus 3 (167 µl *BoviHoldi* ja 333 µl EFMG lahust) sees olid blastotsüstid 5 minutit. 5 minuti möödudes pipeteeriti blastotsüstid hetkeks 500 µl EFMG lahusesse. Edasi tõsteti pipetiga tassi kaanele, mille pealt tõmmati blastotsüstid OPS-körde, mis tõsteti koheselt vedelasse lämmastikku.

Tabel 4. IMV Technologies glütserooliga külmutamise protokollil põhinevad lahused, nende kogused (ml, µl) ja kasutamise aeg (min)

Lahuse kogus	Hoiustamislahus, minutit	Külmutuslahus 1, minutit	Külmutuslahus 2, minutit	Külmutuslahus 3, minutit	EFMG
2 ml	>3				
500 µl		5			
500 µl			5		
500 µl				5	
500 µl					<1

3.3. Embrüote sulatamine

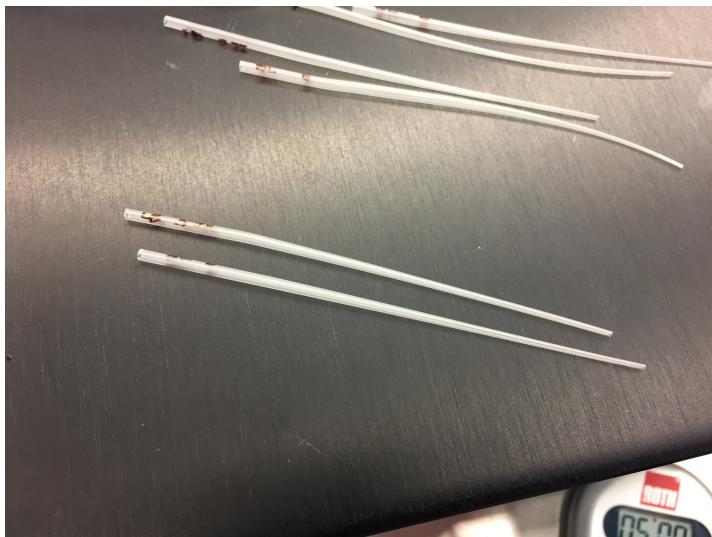
3.3.1. Bioscience protokoll

Protokollis kasutati BO-VitriWarm lahuste kompleksi, mis sisaldas *BO-Warming Medium 1*, *BO-Warming Medium 2*, *BO-Warming Medium 3* ja *BO-Warming Medium 4* lahust. Lahuste komplekt oli etüleenglükooli ja DMSO baasil (Tabel 5).

Veise embrüote sulatamine toimus 37 °C soojaplaadil. Vedelast lämmastikust võeti välja OPS-kõrred (joonis 4), millest lasti embrüod välja valguda 100 µl *BO-Warming 1* lahuse tilka, kus embrüod viibisid enne teise tilka ümber pipeteerimist 3 minutit. Edasi asetati embrüod 80 µl suurusesse *BO-Warming 2* lahuse tilka, kus need viibisid enne kolmandasse tilka pipeteerimist 2 minutit. Kolmandaks tilgaks oli 80 µl *BO-Warming 3* lahus, kus embrüod viibisid enne neljandasse tilka pipeteerimist 2 minutit ning neljandas tilgas oli 80 µl suurune *BO-Warming 4* lahus, milles embrüod viibisid 1 minuti (joonis 5). Pesuks pipeteeriti embrüod 3 ml *BO-IVC* lahusesse. Pärast pesu tõsteti embrüod 4-kann tassile *BO-IVC* lahusesse. Embrüoid kultiveeriti inkubaatoris, nende arenemist ja elujõulisust hinnati 24 h möödumisel.

Tabel 5. Bioscience sulatamise protokollil põhinevad lahused, nende kogused (μl) ja kasutamise aeg (min)

Lahuse kogus	BO-Warming 1, minutit	BO-Warming 2, minutit	BO-Warming 3, minutit	BO-Warming 4, minutit
100 μl	3			
80 μl		2		
80 μl			2	
80 μl				1



Joonis 4. Katsetes kasutatud OPS-kõrred (Autori foto).



Joonis 5. Bioscience veise embrüote sulatuslahuste tilgad (Autori foto).

3.3.2. IMV Technologies etüleenglükooliga külmutamise protokoll järgi sulatamine

IMV Technologies etüleenglükooliga külmutamise protokoll kasutades külmutatud veise embrüod sulatati 37 °C juures (Tabel 6). Embrüotel lasti OPS-kõrrest voolata 80 µl suurusesse *Holding Mediumi* tilka vähemalt 3 minutiks. Edasi pesti embrüoid 2 korda *BO-IVC* lahuses ja tõsteti 4-kannuga tassile *BO-IVC* lahusesse. Embrüoid kultiveeriti inkubaatoris. Edasist embrüo elujõulisust ja arengut hinnati 24 h möödumisel.

Tabel 6. IMV Technologies etüleenglükooliga sulatamise protokollil põhinevad lahused, nende kogused (µl) ja kasutamise aeg (min)

Lahuse kogus	Holding Medium, minutit
80 µl	>3

3.3.3. Etüleenglükooli vitrifikatsioon protokoll järgi sulatamine

Etüleenglükooli vitrifikatsiooni protokoll kasutades külmutatud veise embrüod sulatati soojaplaadil 37 °C juures (Tabel 7). Vedelast lämmastikust võeti embrüotega kõrred, mis pisteti embrüoid sisaldava otsaga 250 µl esimesse sulatuslahusesse (1 ml TCM-199 ja 0,5 M sahharoosi), kus embrüod viibisid 5 minutit, edasi 5 minutiks 50 µl teise sulatuslahusesse (1 ml TCM-199 ja 0.3 M sahharoosi) ja 5 minutiks 50 µl kolmandasse sulatuslahusesse (1 ml TCM-199 ja 0.2 M sahharoosi) (joonis 6). Edasi loputati embrüod 2 korda *BO-IVC* lahuses ja pandi 4-kann tassile *BO-IVC* lahusesse. Embrüoid kultiveeriti inkubaatoris. Nende edasist elujõulisust ja arengut hinnati 24 h möödumisel. Sama meetodit kasutas Van Huong Do *et al.* (2017).

Tabel 7. Etüleenglükooliga vitrifikatsiooni protokollil põhinevad lahused, nende kogused (µl) ja kasutamise aeg (min)

Lahuse kogus	Sulatuslahus 1, minutit	Sulatuslahus 2, minutit	Sulatuslahus 3, minutit
250 µl	5		
50 µl		5	
50 µl			5



Joonis 6. Veise embrüote sulatuslahustega tass (Autori foto).

3.3.4. IMV Technologies glütserooliga külmutamise protokoll järgi sulatamine

IMV Technologies glütserooliga külmutamise protokoll kasutades sulatati veise embrüoid 37 °C juures (Tabel 8). OPS-kõrrest lasti valguda embrüod 3 ml EFMG (*Embryo Freezing Media with Glycerol*) lahuse sisse, milles viibisid 30 sekundit. Esimeses loputustassis tõsteti embrüoid edasi teise loputustassi, kus oli 3 ml sulatamislahust (*Embryo Thawing Media with saccharose*), seal viibisid embrüod 5 minutit. Embrüoid loputati 2 korda *BO-IVC* lahuses ja seejärel tõsteti 4-kann tassile, mis sisaldas *BO-IVC* lahust. Embrüoid kultiveeriti inkubaatoris, misjärel hinnati nende edasist elujõulisust ja arengut 24 h möödumisel.

Tabel 8. IMV Technologies glütserooliga sulatamise protokollil põhinevad lahused, nende kogused (ml) ja kasutamise aeg (min)

Lahuse kogus	EFMG, minutit	Sulatamislahus sahharoosiga, minutit
3 ml	0,5	
3 ml		5

4. TÖÖ TULEMUSED JA ARUTELU

Veise embrüoid külmutati nelja erinevat protokolliga kasutades: 1) Bioscience lahuste ja protokolliga, 2) etüleenglükooliga külmutamise protokolliga, 3) etüleenglükooliga vitrifikatsiooni protokolliga, 4) glütserooliga külmutamise protokolliga. Embrüote elujõulisust ja arengut hinnati 24 h pärast sulatamist.

Antud uurimistöö eesmärgiks oli tuvastada parimat sobilikku veise embrüo arengufaasi vitrifikatsiooni puhul. Katsete tulemusel selgus (Tabel 9), et kõige edukam oli embrüote külmutamine laienenud blastotsüsti arengufaasis (19% juhtudel elujõulised embrüod) võrreldes blastotsüsti (15%) ja koorunud blastotsüsti (9%) arengufaasiga.

Tabel 9. Erinevates arengujärgkutes külmutatud ning sulatatud veise embrüote ellujäämus pärast 24 h kultiveerimist, baseerub kõigi nelja protokollil põhjal

Arengujärk	Sulatatud embrüod, n	Ellujäänud embrüod pärast sulatamist 24 h möödudes, n	Ellujäänud embrüod pärast sulatamist 24 h möödudes, %
Blastotsüst	112	17	15
Laienenud blastotsüst	95	18	19
Koorunud blastotsüst	54	5	9

Bioscience protokollil põhjal läbiviidud katsete tulemusel selgus (Tabel 10), et kõige edukam oli külmutamine blastotsüsti arengufaasis (53% juhtudel elujõulised embrüod) võrreldes laienenud blastotsüsti (26%) ja koorunud blastotsüsti (6%) arengufaasiga.

Tabel 10. Erinevates arengujärgkutes külmutatud ning sulatatud veise embrüote ellujäämus pärast 24 h kultiveerimist, baseerub Bioscience lahuste protokollil

Arengujärk	Sulatatud embrüod, n	Ellujäänud embrüod pärast sulatamist 24 h möödudes, n	Ellujäänud embrüod pärast sulatamist 24 h möödudes, %
Blastotsüst	17	9	53
Laienenud blastotsüst	47	12	26
Koorunud blastotsüst	28	5	18

Etüleenglükooliga külmutamise protokollil põhjal läbiviidud katsete tulemusel selgus (Tabel 11), et külmutamine oli edukam laienenud blastotsüsti arengufaasis (17% juhtudel elujõulised embrüod) võrreldes blastotsüsti (2%) arengufaasiga.

Tabel 11. Erinevates arengujärgkudes külmutatud ning sulatatud veise embrüote ellujäämus pärast 24 h kultiveerimist, baseerub etüleenglükooliga külmutamise protokollil

Arengujärk	Sulatatud embrüod, n	Ellujäänud embrüod pärast sulatamist 24 h möödudes, n	Ellujäänud embrüod pärast sulatamist 24 h möödudes, %
Blastotsüst	44	1	2
Laienenud blastotsüst	12	2	17

Etüleenglükooliga vitrifikatsiooni protokollil põhjal läbiviidud katsete tulemusel selgus (Tabel 12), et kõige edukam oli külmutamine laienenud blastotsüsti arengufaasis (44% juhtudel elujõulised embrüod) võrreldes blastotsüsti (23%) ja koorunud blastotsüsti (0%) arengufaasiga.

Tabel 12. Erinevates arengujärgkudes külmutatud ning sulatatud veise embrüote ellujäämus pärast 24 h kultiveerimist, baseerub etüleenglükooliga vitrifikatsiooni protokollil

Arengujärk	Sulatatud embrüod, n	Ellujäänud embrüod pärast sulatamist 24 h möödudes, n	Ellujäänud embrüod pärast sulatamist 24 h möödudes, %
Blastotsüst	30	7	23
Laienenud blastotsüst	9	4	44
Koorunud blastotsüst	3	0	0

Glütserooliga külmutamise protokollil põhjal läbiviidud katsete tulemusel selgus (Tabel 13), et katse oli ebaedukas ja ellujäänud embrüoid ei olnud üheski arengufaasis.

Tabel 13. Erinevates arengujärgkudes külmutatud ning sulatatud veise embrüote ellujäämus pärast 24 h kultiveerimist, baseerub glütserooliga külmutamise protokollil

Arengujärk	Sulatatud embrüod, n	Ellujäänud embrüod pärast sulatamist 24 h möödudes, n	Ellujäänud embrüod pärast sulatamist 24 h möödudes, %
Blastotsüst	21	0	0
Laienenud blastotsüst	27	0	0
Koorunud blastotsüst	23	0	0

Seda kinnitab ka Shirazi (2008), kes viis läbi katse, kus võrdles vitrifikatsiooni mõju veiste blastotsüstidele ja laienenud blastotsüstidele. Krüoprotektantideks olid glütserool ja etüleenglükool. Embrüote eluvõimet hinnati kolmel järjestikusel päeval. Hindamiskriteeriumiks oli blastotsüstide laienemine ja koorumine. 72 h pärast sulatatud embrüote kultiveerimist oli blastotsüstidest elus 65% ja laienenud blastotsüstidest 81,5% ning koorumise määr vastavalt 30% ja 44,6%. Shirazi arvas, et laienenud blastotsüstid taluvad vitrifikatsiooniprotsessi paremini, kuna hilisemas arengujärgus olevatel veiste blastotsüstidel on parem rakumembraani läbilaskvus, millega väheneb embrüo kahjustamise oht.

Ka Massip (2001) on oma ülevaateartiklis välja toonud, et hilisemas arengujärgus olevad blastotsüstid taluvad paremini külmutamist kui varajase blastotsüsti arengujärgus olevad embrüod. Kõige paremini kannatavad vitrifikatsiooni 7-päevased laienenud blastotsüstid.

Koorunud blastotsüstide peal on läbi viidud vähe katseid, kuna suurem embrüo sisaldab rohkem vett, millega kaasneb suurem oht jääkristallide tekkeks (Kasai, Edashige, 2007). Kuna koorunud blastotsüst on *zona pellucida* seest väljunud, on see tundlikum ja vähem tolerantsem krüoprotektantide suhtes (Vajta, Nagy, 2006). Lisaks võtab suurema hulga vee embrüost välja viimine rohkem aega, mis võib suurendada krüoprotektantide toksilist mõju (Kasai, Edashige, 2007).

Käesoleva töö katsed tõestasid, et koorunud blastotsüstide arengufaas ei ole hea nende külmutamiseks. Mitmed koorunud blastotsüstid olid pärast vitrifikatsiooni osaliselt või täielikult lagunened. Antud uurimistööd arvestades peaks edasi uurima blastotsüstide arengut 72 h jooksul kuni koorumise arengufaasini, nagu tegi Shirazi (2008).

Katsete tulemusi muudavad ka erinevad krüoprotektandid ning nende erinevate kontsentratsioonide ja segude koostis katsetes (Nicacio *et al.*, 2011). Käesolevas töös võrreldi omavahel nelja protokoll, selgitamaks, milline protokoll on veiste embrüote vitrifikatsiooniks kõige efektiivsem (Tabel 14). Etüleenglükooli ja DMSO baasil (1) Bioscience lahustega oli külmutamise protokoll tulemuseks 92 sulatatud veiste embrüost 24 h möödumisel elujõuliseid 26 (28%). Etüleenglükooli ja DMSO baasil (3) Van Huong Do kiire vitrifikatsiooni alusel koostatud protokoll tulemuseks oli 42 sulatatud embrüost 24 h möödumisel 11 (26%) elujõulist. Etüleenglükooli baasil (2) IMV Technologies

protokolli tulemuseks oli 56 sulatatud embrüost 24 h möödumisel 3 (5%) elujõulist. (4) Glütserooli baasil IMV Technologies protokollis sulatati 71 embrüot, mis olid kõik 24 h möödudes hukkunud.

Tabel 14. Nelja läbiviidud protokoll tulemused

Protokoll	Sulatatud embrüod, n	Ellujäänud embrüod pärast sulatamist 24 h möödudes, n	Ellujäänud embrüod pärast sulatamist 24 h möödudes, %
Bioscience lahused	92	26	28
IMV Technologies etüleenglükool	56	3	5
Etüleenglükooliga vitrifikatstioon	42	11	26
IMV Technologies Glütserool	71	0	0

Eelmainitud Shirazi (2008) katses kasutati vitrifikatsiooni lahuses krüoprotektantidena 1,4 M glütserooli ja 3,6 M etüleenglükooli lahust, lisaks oli kõrde lisatud 0,5 M sahaaroosi. Sulatamisel kasutati rakusiseste krüoprotektantide eemaldamiseks 0,5 M sahharoosi.

2017. aastal viis Van Huong Do läbi katse, kus võrdles kolme krüopreservatsiooni protokollide efektiivsust: aeglane külmutamine ning aeglase ja kiire tasakaalustamisega vitrifikatsioon. Kõik munarakud pärinesid tapamajast ja kõiki veise embrüoid toodeti samadel tingimustel. Van Huong Do viis külmutamise katsed läbi hea kvaliteediga laienenud blastotsüstide peal. Peamiseks lahuse koostisosaks kõikides protokollides kasutati etüleenglükooli. Kiire ja aeglase tasakaalustamisega vitrifikatsiooni protokollid olid sarnased. Ainukesed erinevused olid, et esimene viidi läbi 37 °C soojaplaadil ja teine toatemperatuuril ning tasakaalustamise lahuses viibisid esimese protokolliga embrüod 3 minutit, teise protokolliga 8 minutit. Külmutamise puhul kasutati *Cryotop* kõrt. Pärast kõigi kolme katse embrüote sulatamist kultiveeriti neid 24 tundi ning võrreldi kõigi embrüote laienemise efektiivsust (Tabel 15). Kõige enam jäi ellu laienenud blastotsüste kiire vitrifikatsiooni protokolliga (96,1%), kuid ka aeglase vitrifikatsiooni protokolliga saadi samaväärne tulemus (96,0%), madalam tulemus saadi aeglase külmutamisega (89,4%). Katseid võrreldi kontrollgrupiga (100%), mille puhul ei olnud külmutamist kasutatud. Pärast 48 h kultiveerimist võrreldi laienenud blastotsüstide koorumist. Koorunute arv laienenud blastotsüstidest oli kõikide katsete puhul vähenenud, kõige

vähem koorunud oli aeglane külmutamisega (73,8%), sellele järgnes koorunud blastotsüstide poolest aeglane vitrifikatsioon (87,5%), kiire vitrifikatsioon (93,9%) ja kontrollgrupp (98,0%). Selle uurimusega demonstreeris Van Huong Do, et vitrifikatsioon, mille peamiseks krüoprotektandiks on etüleenglükool, on hea ja efektiivne krüopreservatsiooni meetod.

Tabel 15. Laienenud ja koorunud blastotsüstide elujõulisuse võrdlus erinevate krüopreservatsiooni protokollide kasutamisel (Do *et al.*, 2017)

Protokoll	Sulatatud blastotsüstid, n	Uuesti laieneud blastotsüstid pärast sulatamist 24 h möödudes, n (%)	Koorunud blastotsüstid 48 h, laienenud blastotsüstidest, n (%)
Kontrollgrupp	51	51 (100)	50 (98,0)
Aeglane külmutamine	47	42 (89,4)	31 (73,8)
Kiire vitrifikatsioon	51	49 (96,1)	46 (93,9)
Aeglane vitrifikatsioon	50	48 (96,0)	42 (87,5)

Etüleenglükooli eeliseks peetakse tema head rakumembraani läbivust, mis võimaldab sulatamisel ära jätta astmelise lahjenduse. Käesoleva töö kolmas protokoll on koostatud Van Huong Do katse põhjal, erinevuseks TCM-199 lahuse koostis ja kõrre tüüp. Van Huong Do kasutas HEPES-baasil TCM-199 lahust ja *Cryotop* kõrt, käesoleva töö protokollis kasutati TCM-199 lahust, milles ei olnud HEPES puhvrit ja kasutati OPS-kõrt. Käesolev uurimistöö on läbi viidud Van Huong Do uurimistöö põhjal koostatud etüleenglükooliga kiire vitrifiaktsiooniprotokolliga. Van Huong Do katse tulemused on näha tabelis 16, millest võib välja lugeda, et laienenud blastotsüstide uuesti laienemise protsent oli 24 h möödumisel sulatamisest 96,1. Tabelis 16 on ka näha, et antud uurimistöö puhul oli laienenud blastotsüstide uuesti laienemise protsent 44. Erinevus võis tuleneda TCM-199 lahuse koostise erinevusest või erineva kõrre kasutamisest. Lisaks uuriti sama protokolliga ka blastotsüstide ja koorunud blastotsüstide peal, kus tulemuseks saadi 24 h hindamisel 30 sulatatud blastotsüstist 1 elujõuline blastotsüst, 5 laienenud ja 1 koorunud blastotsüst. 3 külmutatud koorunud blastotsüstist lagunesid kõik sulatamisel täielikult. Ka nende tulemuste põhjal võib järeldada, et antud meetodiga on kõige efektiivsem kasutada külmutamiseks laienenud blastotsüsti arengufaasis veise embrüoid.

Tabel 16. Van Huong Do ja käesoleva töö sulatatud ja 24 h möödudes uuesti laienenud blastotsüstide võrdlus

Protokoll	Sulatatud blastotsüstid, n	Uuesti laienenud blastotsüstid 24 h möödudes, n	Uuesti laienenud blastotsüstid 24 h möödudes, %
Etüleenglükooliga vitrifikatsioon	9	4	44
Van Huong Do kiire vitrifikatsioon	51	49	96

Taniguchi viis 2007. aastal läbi katse, mille eesmärgiks oli võrrelda erinevate kontsentratsioonidega vitrifikatsioonilahuste efektiivsust veise embrüote ellujäämuses. Krüoprotektantideks olid glütserool ja etüleenglükool (Tabel 17). Katsetati kolme lahust, mille sisaldused olid 40% glütserool, 30% glütserool ja 10% etüleenglükool ning 20% glütserool ja 20% etüleenglükool. Kõiki lahuseid katsetati kokku 55 embrüo peal. Tulemuseks oli kõige suurem embrüote ellujäämus 40% glütserooli lahuse puhul (40 embrüot), teisena 30% glütserooli ja 10% etüleenglükooli lahuse puhul (36 embrüot) ning kõige vähem jäi embrüoid ellu pärast sulatamist 20% glütserooli ja 20% etüleenglükooli lahuse puhul (31 embrüot). Kõikide lahuste puhul lisati sulatamisel juurde kolmas krüoprotektant – sahharoos (Taniguchi *et al.*, 2007). Samas vajab glütserooli baasil külmutamine etüleenglükooliga võrreldes astmelist lahjendust, vältimaks embrüo osmootilist šokki, lisaks on see vähem rakumembraani läbiv (Bondioli, 2014).

Tabel 17. Glütserooli ja etüleenglükooli erinevates kontsentratsioonides lahuste võrdlus (Taniguchi *et al.*, 2007)

Lahused	Külmutatud embrüod, n	Ellujäänud embrüod pärast sulatamist, n
40% glütserool	55	40
30% glütserool ja 10% etüleenglükool	55	36
20% glütserool ja 20% etüleenglükool	55	31

Käesolevas uurimistöös läbi viidud katse glütserooli protokollil põhjal võib järeldada, et katse ebaõnnestus – kõik katses olnud veise embrüod hukkusid. Kasutuses oli üheastmeline sulatamine, kuid parema tulemuse saavutamiseks peaks katsetama astmelist

sulatamise meetodit. Elujõuliste embrüote suurema arvu saavutasid etüleenglükooli ja DMSO baasil teostatud protokollid.

Katse tulemuste edukuse määrab lisaks lahustele, meetodile ning veise embrüo arengufaasile ka katsevahendite ning -materjalide steriilsus. Saaste sattumine proovidesse võib tuleneda munarakkudest või spermast (mikrobiaalne saastaja *Escherichia coli* või *Candida* liigid), üksikust juuksekarvast (mikrobiaalne saastaja *Staphylococcus aureus*), OPS kõrrest või selle kontainerist tolmust või lahuse tootmisel saastunud lahustest. Saaste ennetuseks on lisatud lahustesse antibiootikume, kuid mõnel mikroobi liigil võib nende vastu resistentsus esineda. (Vajta, Nagy, 2006)

Käesoleva töö tulemusel väidab autor, et katsete läbiviimise edu või ebaedu võib tuleneda erinevatest teguritest, mis kõik võivad olla katse tulemuse muutjaks ka samaväärsetes katsetes. Seetõttu on väga oluline jälgida ning võimalusel vältida kõiki katsetulemusi negatiivselt mõjutada võivaid tegureid.

Tegurid, mis võivad mõjutada vitrifikatsiooni tulemust:

1. Personali ebapiisav väljaõpe. Sellest võib tuleneda ebapiisav katse läbiviimise kiirus (kvaliteedi langus) ja kvaliteetsete munarakkude ja embrüote morfoloogilise hindamise puudulikkus ehk valitakse välja lisaks kvaliteetsetele ka ebakvaliteetseid embrüoid.
2. Embrüote kehv kvaliteet, mille tingivad valesti valitud embrüod ja vales arengujärgus embrüo külmutamine.
3. Valesti valitud külmutamise meetod.
4. Lahuste sobimatu koostis, osakaal ja kogus. Näiteks aeglane külmutamine ja vitrifikatsioon vajavad erineva krüoprotektantide sisaldusega lahuseid, lisaks on krüoprotektantide osakaal suure tähtsusega ka erinevates arengufaasides olevate blastotsüstide puhul.
5. Jääkristallide teke.
6. Saaste.

KOKKUVÕTE

Vitrifikatsiooni edukus ei ole veel piisav, et täielikult kõrvale lükata aeglane külmutamine, mis on hetkel embrüote külmutamisel rohkem kasutust leidnud. Küll aga on mitmeid katseid teostatud selgitamaks, millistes oludes võib vitrifikatsioon edukamaks osutuda. Katseid embrüote erinevate arengufaasidega on läbi viidud välja selgitamaks, millised krüoprotektandid ja milliste kontsentratsioonidega lahused veise embrüote vitrifikatsioonil kõige paremaid tulemusi annavad. Embrüote edukaks säilitamiseks on lisaks ka väga tähtis embrüo enda kvaliteet, selle kuju, suurus, arengujärk, tundlikkus ja membraani läbilaskvus.

Käesoleva töö eesmärk on teadustööde ja katsete põhjal välja selgitada, millises arengufaasis ja milliste lahustega on veise embrüote ellujäämus pärast vitrifikatsiooni suurim. Seni tehtud uuringute põhjal võib eeldada, et külmutamiseks kõige parem veise embrüo arengujärk on laienenud blastotsüsti arengufaas. Ka antud katsete tulemused kinnitasid seda hüpoteesi. Töös kasutatud protokollide kasutamise tulemusel võib väita, et vitrifikatsiooni läbiviimiseks on kõige vastupidavamad laienenud blastotsüstid. Kõige efektiivsem külmutamise lahus baseerub etüleenglükoolil ja DMSO'l.

Teadusmaailmas leidub vitrifikatsiooni kohta palju uurimistöid, kuid katsete läbiviimise meetodid varieeruvad suures osas ning mingit ühte, konkreetset ja põhjapanevat tõestust neist välja lugeda ei saa. Kõige täpsemad ja võrreldavad katse tulemused saadakse siis, kui neid tehakse sama tehnoloogia ja materjalidega ning vaid ühe muutuva teguriga. Veelgi täpsemate tulemusteni jõudmiseks tuleks pikendada katseid embrüosiirdamise ja elussündide tulemuste saamiseks.

Lühiajalised külmutuskatsed, nagu käesolevas uurimuses, kus embrüote elujõulisust ja arengut hinnatakse 24 h jooksul pärast sulatamist, annavad üldpildi veise embrüote elujõulisusest pärast sulatamist.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Alminana, C., Cuello, C.** (2015). What is new in the cryopreservation of embryos? – *Animal Reproduction*. Vol. 12, No. 3, lk 418–427.
- Arav, A.** (2014). Cryopreservation of oocytes and embryos. – *Theriogenology*. Vol. 81, No. 1, lk 96–102.
- Bondioli, K.** (2014). Cryopreservation of Bovine Embryos. – *Bovine Reproduction* (1. tr). / Toim. R. M. Hopper. Lk 718–722.
- Chaves, D. F., Corbin, E., Almiñana, C., Locatelli, Y., Souza-Fabjan, J. M. G., Bhat, M. H., Mermillod, P.** (2017). Vitrification of immature and in vitro matured bovine cumulus-oocyte complexes: Effects on oocyte structure and embryo development. – *Livestock Science*. Vol. 199, lk 50–56.
- Do, V. H., Simon, W., Sally, C., Taylor-Robinson, A. W.** (2017). A comparative analysis of the efficacy of three cryopreservation protocols on the survival of in vitro-derived cattle embryos at pronuclear and blastocyst stages. – *Cryobiology*. Vol. 77, lk 58–63.
- Dobrinsky, J. R.** (2002). Advancements in cryopreservation of domestic animal embryos. – *Theriogenology*. Vol. 57, No. 1, lk 285–302.
- Cryoconservation of animal genetic resources. (2012). Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rooma. 204 lk.
- Gordon, I.** (2017). Reproductive Technologies in Farm Animals (2nd tr). Boston: CABI. 342 lk.
- Gupta, A., Singh, J., Anzar, M.** (2016). Effect of cryopreservation technique and season on the survival of in vitro produced cattle embryos. – *Animal Reproduction Science*. Vol. 164, lk 162–168.
- Hasler, J. F.** (2014). Forty years of embryo transfer in cattle: A review focusing on the journal *Theriogenology*, the growth of the industry in North America, and personal reminiscences. – *Theriogenology*. Vol. 81, lk 152–169.
- Kasai, M., Edashige, K.** (2007). Vitrification in animal reproduction: vitrification of embryos using conventional straws with an ethylene glycol-based solutions. – *Vitrification in Assisted Reproduction*. / Toim. M. J. Tucker, J. Liebermann. 304 lk.
- Kastrop, P. M. M., Graaf-Miltenburg, L. A. M., Gutknecht, D. R., Weima, S. M.** (2007). Microbial contamination of embryo cultures in an ART laboratory: sources and management. – *Human Reproduction*. Vol. 22, No. 8, lk 2243–2248.
- Koemets, M.-L.** (2018). Tõuaretajad edendavad embrüosiirdamisel põhinevat veisekasvatust. – *Ajakiri Maaülikool*. Vol. 9, lk 30–32.

- Mandawala, A. A., Harvey, S. C., Roy, T. K., Fowler, K. E.** (2016). Cryopreservation of animal oocytes and embryos: Current progress and future prospects. – *Theriogenology*. Vol. 86, No. 7, lk 1637–1644.
- Mark, E.** 2014. Veise *in vitro* toodetud embrüote metabooloomika ja kasvulahuste mikrobioloogia. Magistritöö. Eesti Maaülikooli Sigimisbioloogia osakond. Tartu. 48 lk.
- Massip, A.** (2001). Cryopreservation of Embryos of Farm Animals. – *Reproduction in Domestic Animals*. Vol. 36, No. 2, lk 49–55.
- Naik, B. R., Rao, B. S., Vagdevi, R., Gnanprakash, M., Amarnath, D., Rao, V. H.** (2005). Conventional slow freezing, vitrification and open pulled straw (OPS) vitrification of rabbit embryos. – *Animal Reproduction Science*. Vol. 86, lk 329–338.
- Nicacio, A. C., Simoes, R., Paula-Lopes, F. F., Barros, F. R. O., Peres, M. A., Assumpção, M. E. O. D., Visintin, J. A.** (2011). Effects of different cryopreservation methods on post-thaw culture conditions of *in vitro* produced bovine embryos. – *Zygote*. Vol. 20, lk 117–122.
- Sanches, B. V., Zangirolamo, A. F., Silva, N. C. da, Morotti, F., Seneda, M. M.** (2017). Cryopreservation of *in-vitro*-produced embryos: challenges for commercial implementation. – *Animal Reproduction*. Vol. 14, No. 3, lk 521-527.
- Shirazi, A., Shams-Esfandabadi, N., Nazari, H., Ahmadi, E., Heidari, B.** (2008). Developmental Stage of *in vitro* Produced Bovine Embryos Influence the Cryotolerance of Vitrified Embryos. – *The 15'th Congress of FAVA*. Bangkok, lk 45-46.
- Taniguchi, M., Ikeda, A., Arikawa, E., Wongsrikeao, P., Agung, B., Naoi, H., Otoi, T.** (2007). Effect of Cryoprotectant Composition on *in vitro* viability of *in vitro* fertilized and cloned bovine embryos following vitrification and *in-straw* dilution. – *Journal of Reproduction and Development*. Vol. 53, No. 4, lk 963–969.
- Vajta, G., Kuwayama, M.** (2006). Improving cryopreservation systems. – *Theriogenology*. Vol. 65, No. 1, lk 236–244.
- Vajta, G., Nagy, Z. P.** (2006). Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. – *Reproductive BioMedicine Online*. Vol. 12, No. 6, lk 779–796.
- Youngs, C. R.** (2011). Cryopreservation of Preimplantation Embryos of Cattle, Sheep, and Goats. – *Journal of Visualized Experiments: JoVE*. Vol. 54.

**Lihtlitsents lõputöö salvestamiseks ja üldsusele
kättesaadavaks tegemiseks ning juhendaja(te) kinnitus
lõputöö kaitsmisele lubamise kohta**

Mina, Hanna Raidvere,

sünniaeg 22.10.1990,

1. annan Eesti Maaülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda koostatud
lõputöö

Veise *in vitro* toodetud embrüote vitrifikatsioon ja elujõulisus pärast sulatamist

mille juhendaja on Elina Mark,

1.1. salvestamiseks säilitamise eesmärgil, 1.2. digiarhiivi DSpace
lisamiseks ja 1.3. veebikeskkonnas üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile;

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute
intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Lõputöö autor _____ (allkiri)

Tartu, _____ (kuupäev)

Juhendaja kinnitus lõputöö kaitsmisele lubamise kohta

Luban lõputöö kaitsmisele. _____

(juhendaja nimi ja allkiri)

_____ (kuupäev)